نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره ۳/ سال ۱۳۹۴

پوشش‌دار کردن لیپوزومی آنزیم فلیورزیم و تاثیر آن بر ویژگی‌های سینتیکی آن

زهرا وفابخش[۱]، کیانوش خسروی دارانی[۲]*، سید علی مرتضوی[۳]، خسرو خواجه[۴]، مهشید جهادی[۵]، مهرداد محمدی[۶]، غزاله بهرامیان[۷] و رزیتا کمیلی فنود[۶]

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹٤/۵/۲۱

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] دانشیار گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

[۳] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[٤] استاد بیوشیمی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

[۵] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان

[٦] کارشناس، گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

[۷] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی- فناوری مواد غذایی؛ دانشکده صنایع غذایی؛ دانشگاه آزاد اسلامی واحد بین الملل آیه‌الله آملی؛ آمل

*مسئول مکاتبه: Email: k.khosravi@sbmu.ac.ir

چکیده

تسریع رسیدن پنیر با استفاده از ریزپوشانی پروتئاز مورد توجه محققان صنعت غذا است. در این تحقیق ضمن پوشش‌دار کردن آنزیم فلیورزیم با لیپوزوم به روش حرارتی؛ خواص سینتیکی آنزیم قبل و بعد از ریزپوشانی مقایسه شد. اثر دما و pH بر فعالیت آنزیم با طرح مرکب مرکزی بررسی شد. لیپوزوم با فسفاتیدیل کولین، فلیورزیم و کلسترول به ترتیب به میزان (w/v٪) ٤/۵۰۰، ۰/٦۷۵ و ۰/۲۲۵ تهیه شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بر اساس سرعت واکنش آنزیم با ماده اولیه ال- لوسین پی نیتروآنیلید بود. نتایج نشان داد پوشش‌دار کردن آنزیم درون لیپوزوم موجب افزایش معنی‌دار ثابت میکائیلس-منتن و بیشینه سرعت آنزیم فلیورزیم می‌شود ($P<۰/۰۵$)، اما تغییر معنی‌داری در pH و دما بهینه آنزیم ایجاد نمی‌کند. بررسی پایداری حرارتی با روش سطح پاسخ نشان داد که آنزیم پوشش‌دار شده در دمای ۳۵°C به مدت ٦ ساعت پایدار ماند. در دمای ٦۵ و ۷۵°C پایداری حرارتی فلیورزیم پوشش‌دار نسبت به آنزیم آزاد کاهش یافت. پایداری آنزیم پوشش‌دار در pH ۷ و ۸ افزایش و در شرایط اسیدی کاهش یافت. خواص سینتیکی آنزیم قبل و بعد از پوشش در لیپوزوم تفاوت معنی‌داری نداشت اما مقایسه روند پروتئولیز در نمونه‌های حاوی آنزیم آزاد و پوششدار شده حاکی از پروتئولیز تدریجی کازئین در آنزیم لیپوزمی می‌باشد. لذا استفاده از روش حرارتی راهکاری مناسب جهت پوشش‌دار کردن آنزیم پروتئاز با هدف تسریع رسین پنیر است.

واژگان کلیدی: فلیورزیم، پوشش‌دار کردن، لیپوزوم، پارامترهای سینتیکی

مقدمه

رسیدن پنیر یکی از پیچیده‌ترین پدیده‌های شیمیایی است که در رابطه با هضم آنزیمی ترکیبات اساسی لخته اتفاق می‌افتد. ماده اولیه در رسیدن پنیر، کازئین، چربی و ترکیبات محلول شیر می‌باشد. با وقوع واکنشهای بیو- شیمیایی رسیدن پنیر واکنشهای گلیکولیز، لیپولیز و پروتئولیز در لخته پنیر رخ می‌دهد به این ترتیب لخته که در آغاز سفت و بدون عطر و طعم می‌باشد با ایجاد این تغییرات به لخته‌ای با عطر، طعم، بافت و رنگ متفاوت تبدیل می‌شود. در بین روش‌های تسریع رسیدن پنیر پوشش‌دار کردن آنزیم پروتئاز روشی منطقی و مقرون به صرفه است، زیرا به این روش می‌توان به‌طور اختصاصی میزان پروتئولیز را هدفمند کنترل نمود. به‌کارگیری آنزیم آزاد به منظور تسریع رسیدن پنیر موجب ازدست رفتن بخش عمده آنزیم در آب پنیر می‌شود. پوشش‌دار کردن آنزیم موجب بقاء بیشتر آنزیم در ساختار لخته پنیر می‌شود. به کارگیری لیپوزوم های حاوی پروتئازها در پنیرموجب محافظت کازئین را از هیدرولیز سریع در حین تولید و در نتیجه، ممانعت از افت راندمان پنیرسازی و میسل‌های کازئین در نتیجه بهبود عملکرد آنزیم می‌شود (آنجانی و همکاران ۲۰۰۷، محمدی و همکاران ۱۳۹۱). اخیرا تحقیقاتی در زمینه پوششدار کردن پروتئازهای تسریع کننده رسیدن پنیر مانند کیموزین، فلیورزیم، کیموتریپسین (الخلف و همکاران ۱۹۸۹ و چانگ و همکاران ۲۰۰۷ و کولاس و همکاران ۲۰۰۷ و خیدر و همکاران ۲۰۰۳ و لالوی و همکاران ۱۹۹۸)، پروتئیناز (الخلف و همکاران ۱۹۸۹، پیکون و همکاران ۱۹۹۵) لیپاز (خیدر و همکاران ۲۰۰۳) در لیپوزوم، کاراگینان و چربی شیر انجام پذیرفته است. لیپوزومهای ساختارهای دوگانه دوستی می‌باشند که به عنوان حاملهای مناسب ترکیبات صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (کلر ۲۰۰۱، مظفری و همکاران ۲۰۰۸). استفاده از روش حرارتی به منظور تولید لیپوزوم، شامل هیدراتاسیون ترکیبات تشکیل‌دهنده لیپوزوم در یک محیط آبی، و به دنبال آن حرارت دادن این ترکیبات در حضور گلیسرول (۳٪ v/v) تا ۱۲۰°C است (مظفری ۲۰۰۵). فلیورزیم (EC:۳,٤,۱۱,۱) یک مخلوط پیچیده از پروتئاز و پپتیداز قارچی است که توسط *آسپرژیلوس نیجر* تولید می‌شود. از این آنزیم به عنوان یک آنزیم افزایش‌دهنده طعم در رسیدگی پنیر استفاده می‌شود. این آنزیم در پوشش‌هایی مانند ژلان، کاپا- کاراگینان، چربی شیر با نقطه ذوب بالا، لیپوزوم‌های تولید شده با استفاده از پرولیپوزوم و روش حرارتی اصلاح شده (جهادی و همکاران ۲۰۱۳) پوشش‌دار ش (خیدر و همکاران ۲۰۰۳ و کایلاساپاتی و همکاران ۲۰۰۵). بررسی و مقایسه پروفایل pH و دما و ثابت سینتیکی آنزیم به صورت آزاد و پوشش‌دار شده جهت تعیین کارائی روش پوشش‌دار کردن مورد استفاده قرار می‌گیرد (بویاسی ۲۰۰۵). در این مطالعه از روش حرارتی اصلاح شده توسط جهادی و همکاران (۲۰۱۳) جهت پوشش‌دار کردن لیپوزومی آنزیم فلیورزیم استفاده شد. سپس مشخصات سینتیکی آنزیم مانند، بهینه دما و pH آنزیم پوشش‌دار شده و آزاد با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پایداری حرارتی و pH مطالعه شد. در نهایت، تغییرات اندیس عمق پروتئولیز و شاخص پروتئولیز در شیر حاوری آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش فسفاتیدیل کولین و کلسترول از شرکت Across، گلیسرول و تریتون X-۱۰۰ از شرکت Sigma، ال- لوسین پی نیتروآنیلید[1] از شرکت Fulka تهیه شد. آنزیم فلیورزیم[2] از شرکت Novozyme هدیه گرفته شد. کلیه مواد مورد استفاده در سایر آزمایشات از شرکتهای تجاری و با درجه آنالیزی بود. جهت ساخت محلولها ازآب مورد

[1] L-leucine-p-nitroanilide

استفاده از دستگاه تصفیه آب Milli Q (Millipore, USA) استفاده شد.

تولید لیپوزوم محتوی فلیورزیم

تولید لیپوزوم به شیوه حرارتی اصلاح شده توسط جهادی و همکاران (۲۰۱۳) انجام پذیرفت. لیپوزوم ها توسط فسفاتیدیل کولین، فلیورزیم و کلسترول به ترتیب به میزان(W/V) ۵٪، ٤٪، ٦٧۵٪/۰ و ۰/۲۲۵٪ ساخته شد. کلسترول در محلول ۱۲٪ گلیسرول در دمای بالا (۱۲۰°C) حل شد. اجزاء تشکیل دهنده لیپوزوم (شامل فسفاتیدیل کولین و کلسترول) همزمان به محلول آنزیم (بافر ۰/۰۱ مولار تریس در ٦ pH) در ٤۰°C اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۰°C با سرعت ۹۰۰ دور در دقیقه (HCR2, Gerhardt, Germany) مخلوط شد. محصول نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤°C نگهداری و سپس مورد آزمون قرار گرفت.

جداسازی آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده از آنزیم آزاد

قبل از انجام آزمون‌های مربوط به آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده، باید آنزیم های آزاد جدا شود. بدین منظور محصول نهایی به مدت ۷۵ دقیقه در دمای ٤°C در اولتراسانتریفوژ g× ٤۳۰۰۰ جداسازی سپس با آب دیونیزه شستستو و مجددا سانتریفوژ شد. این فرایند سه بار تکرار شد. در نهایت رسوبات حاصل به حجم ۵ میل لیتر رسانده شد (جهادی و همکاران ۲۰۱۳، خیدر و همکاران ۲۰۰۳).

بررسی فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم بر اساس سرعت واکنش آنزیم با ماده اولیه ال- لوسین پی نیتروآنیلید سنجیده شد. ۱ میلی لیتر از آنزیم پوشش‌دار و آزاد با ۱ میلی لیتر تریتون X-۱۰۰ (۲٪) مخلوط شد تا غشاء لیپوزوم پوشش‌دار شده تخریب شود. ۸۰ µL محلول آنزیم فلیورزیم را با ۸٤۰µ بافر تریس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤۰°C مخلوط شد. سپس به آن ۸۰ µL سوبسترا (۲٤ mµ ال-لوسین پی نیتروآنیلید در الکل مطلق) اضافه شد و تغییرات جذب مخلوط فوق در دقیقه در طول موج ٤۰۵ nm در دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Secomam XTD5, Farance) سنجش شد. فعالیت آنزیم به صورت میکرومول سوبسترای آزاد شده در دقیقه (µmol/min.mL) بیان شد. ضریب خاموشی[1] پی نیتروآنیلین در طول موج ٤۰۵ nm برابر با ۹/۹ است (آنجانی و همکاران ۲۰۰۷).

بررسی اثر pH و دما بر فعالیت آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم

تاثیر pH و دما بر فعالیت آنزیم توسط روش سطح پاسخ (طرح مرکب مرکزی)[2] مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مستقل عبارت از pH (۷-۹) و دما (۶۲°C -۱۲) است. فعالیت نسبی آنزیم (٪) به عنوان متغیر پاسخ طرح درنظر گرفته شد. ماتریکس مرکب مرکزی طراحی شده به همراه نتایج متغیرهای پاسخ (فعالیت نسبی آنزیم آزاد و پوشش دار شده) در جدول ۱ آورده شده است. از نرم افزار Design-Expert ویرایش ۷,۱,۳ جهت طراحی و ارزیابی متغیرهای آماری استفاده شد (الخلف و همکاران ۱۹۸۹، چانگ و همکاران ۲۰۰۷، کولاس و همکاران ۲۰۰۷).

بررسی پارامترهای سینتیکی (K_m، V_{max} و K_{cat}) در آنزیم آزاد و لیپوزومی

ثابت میکائیلس-منتن[3] برای فلیورزیم آزاد و پوشش‌دار با اندازه‌گیری سرعت واکنش آنزیم با غلظتهای مختلف سوبسترا در محدوده ۵-۰/۲ mµ در pH ۸ اندازه‌گیری شد (ویتاکر ۲۰۰۲). ثابت میکائیلیس توسط ارزیابی نتایج مطابق با معادله لاینویور-برگ[4] محاسبه شد. برای محاسبه K_{cat} میزان پروتئین مطابق روش برادفورد اندازه گیری شد (بردفورد ۱۹۷٦).

بررسی پایداری آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم تحت تاثیر pHهای مختلف

جهت بررسی پایداری pH، آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در بافر مخلوط M ۰/۰۱(بافر فسفات و سیترات سدیم) در دمای ۳۵°C در معرض pH های ۸، ۷، ٦ و ۵ به مدت ۷ ساعت قرار گرفت.

---

[1] Extinction coefficient
[2] Central composite design
[3] Michaelis-Menten
[4] Lineweaver-Burk

بررسی پایداری حرارتی آنزیم فلیورزیم در حالت آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم

به منظور بررسی پایداری حرارتی، محلول آنزیمی به صورت آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم به مدت ٦ ساعت تحت تاثیر دما ۳۵، ٤٥ و ٥٥°C قرار گرفته و در فواصل یک ساعته نمونه‌برداری شد. همچنین به منظور بررسی پایداری حرارتی آنزیم فلیورزیم در دماهای بالا، محلول آنزیمی در هر دو شکل، به مدت یک ساعت در دماهای ٥٥°C، ٦٥ و ۷۵ نگهداری شد، و به فاصله ده دقیقه‌ایی نمونه‌برداری انجام گرفت.

مقایسه روند پروتئولیز به وسیله آنزیم فلیورزیم آزاد و پوشش‌دار شده

به منظور مقایسه روند پروتئولیز در نمونه حاوی آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم، شاخص‌های پروتئولیز شاملتغییرات ازت محلول در تری کلرواستیک اسید در هر لحظه نسبت به زمان صفر به ازت کل (TCA- SN/TN) و تغییرات ازت غیر کازئینی در هر لحظه نسبت به زمان صفر به ازت کل (WSN/TN) در شیر بازسازی شده حاوی ۰/۰۳٪ آنزیم فلیورزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم، در سه زمان صفر، یک و چهار ساعت از زمان انکوباسیون نمونه‌ها در ۳۰°C با استفاده از روش کلدال اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری TCA- SN/TN و WSN /TN با استفاده از روش‌های AOAC ۲۰۰۲ و به ترتیب شماره‌های ۹۲۰/۱۲۳ و ۹۹۸/۰۵ انجام گرفت (رودریگز و همکاران ۲۰۰۵ و هیتمن و همکاران ۱۹۹۷).

طرح آماری

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیکهای ریاضی و آماری است که برای مدلسازی و تحلیل پاسخ فرآیندی که تحت تأثیر چندین متغیر می‌باشد، مفید است (باس و همکاران ۲۰۰۷ و کلینن ۲۰۱۰). طرح مرکب مرکزی (CCD) که عبارت از طرح عاملی یا عاملی کسری (کدبندی شده با نماد معمول ±۱) با الحاق 2k نقطه محوری و nc نقطه مرکزی[1] است و برای k فاکتور $X_1, X_2, \ldots, X_n$ کد شده است: نقاط عاملی(2^{k}[2]) مستقر بر رئوس مکعب، نقاط محوری[3] در مرکز صفحات مکعب و نقاط مرکزی در مرکز مکعب. تعداد کل نقاط طرح (N) با فرمول ۱ محاسبه شد:

$$N = 2^k + 2k + C_0 \qquad (۱)$$

k تعداد متغیرها و C_0 تعداد نقاط مرکزی می‌باشد. این روش طرح متداول رویه پاسخ درجه دوم می‌باشد که با افزودن نقاط محوری و یک یا چند نقطه مرکزی از طرح دو عاملی حاصل شده است. در این طرح متغیرها در سه سطح کم، متوسط و زیاد (۱-، ۰، ۱+) تعریف می‌شوند (خسروی دارانی و همکاران ۲۰۰۸). سطوح عوامل طرح CCD در جدول ۱ نشان داده شده است. متغیر های مستقل pH و دما بوده و فعالیت نسبی آنزیم (٪) به عنوان پاسخ طرح درنظر گرفته و تیمارها با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین در سطح اطمینان ۹۵٪ با نرم افزار SAS:9 انجام و نمودارها توسط Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۰۷ رسم شد.

نتایج و بحث

آنزیم فلیورزیم با روش حرارتی اصلاح شده (جهادی و همکاران ۲۰۱۳) به میزان ۲۱/۹٪ پوشش‌دار شد. کارایی ریزپوشانی به عنوان میزان آنزیم فعال محبوس شده در لیپوزوم نسبت به کل فعالیت آنزیم پوشش‌دار شده و غیر پوشش‌دار محاسبه می‌شود (جهادی و همکاران ۲۰۱۳).

بررسی پروفایل pH و دما آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم

سرعت واکنش‌های کاتالیز شده آنزیمی تحت تاثیر تغییرات pH و دما قرار می‌گیرد. جایگاه فعال آنزیم از گروه‌های یونی تشکیل شده است. قرارگیری گروه‌های یونی فوق در جایگاه مناسبی موجب حفظ شکل مناسب آنزیم و در نهایت واکنش بهتر آنزیم با سوبسترا شود (رودریگز و همکاران ۲۰۰۵). اختلاف در فعالیت آنزیم فلیورزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم به عنوان تابعی از pH و دما با استفاده از طرح آماری رویه پاسخ و مرکب مرکزی بررسی

[1] Center point

[2] Factorial point or cube point

[3] Axial point or star point

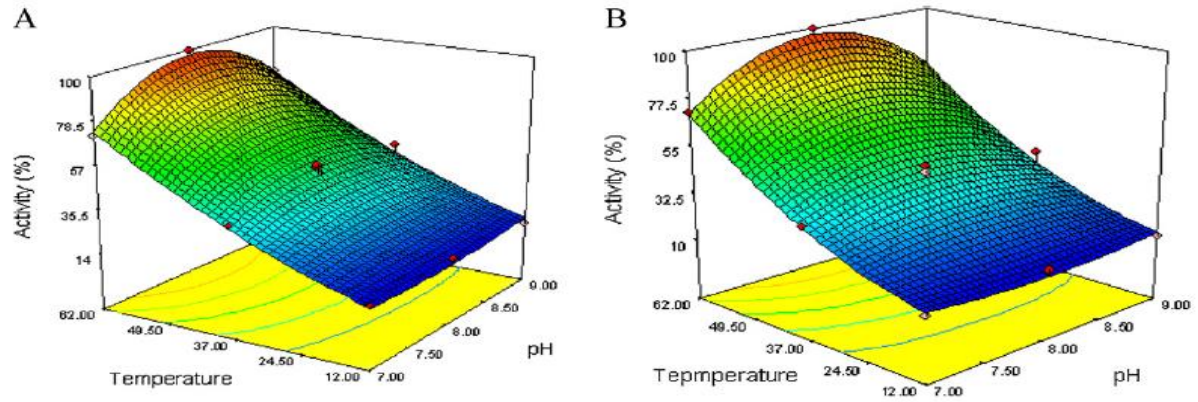
شد. شکل ۱ به ترتیب نمودار کانتور و سه بعدی مربوط به آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم را نشان می‌دهد. واضح است که در هر دو فرم، فعالیت آنزیم به تغییرات دما حساس‌تر از تغییرات pH می‌باشد. همچنین اثر pH بر روی فعالیت آنزیم در دماهای بالا مانند ۶۲°C محسوس‌تر از دماهای پایین بوده است. در نهایت استنباط می‌شود که استفاده از روش حرارتی یا همان روش مظفری در ریزپوشانی آنزیم فلیورزیم رفتار آنزیم را در محدوده pH و دما مورد بررسی تحت تاثیر قرار نداده است، و هر دو فرم آنزیم رفتار مشابه‌ایی را در این محدوده دنبال کرده‌اند.

تعیین پارامترهای سینتیکی (K_m، V_{max} و K_{cat}) در آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم

دراین مطالعه جهت ارزیابی اثر فرایند پوشش‌دار کردن به روش حرارتی بر فعالیت آنزیم، پارامترهای سینتیکی آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده K_m، V_{max} و K_{cat}، از طریق محاسبه سرعت واکنش آنزیمی در غلظت‌های مختلف سوبسترا (۰/۰۵ تا ۰/۲ میلی‌مولار)، تعیین و با نمونه کنترل (آنزیم آزاد) مقایسه شد.

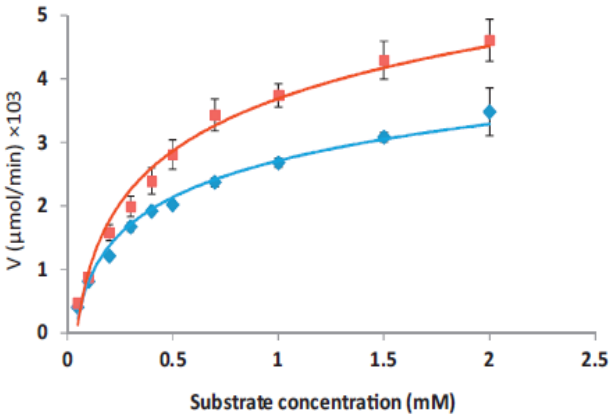
جدول ۱- ماتریکس مرکب مرکزی برای متغیر پاسخ فلیورزیم آزاد و پوشش دار شده

	متغیر مستقل		متغیر وابسته (فعالیت آنزیم فلیورزیم)	
شماره نمونه	pH	دما (°C)	آزاد	پوشش‌دار شده
۱	۷	۶۲	۷۲	۷۱
۲	۸	۳۷	٤٦	٤١
۳	۸	۳۷	٤٨	٤٣
٤	۸	۳۷	٥٢	٤٦
٥	۸	۱۲	۱۷	۱۳
٦	۷	۳۷	٤٠	۳٤
۷	۹	۶۲	۷۷	٦٩
۸	۸	۶۲	۱۰۰	۱۰۰
۹	۹	۳۷	٤٦	۳۹
۱۰	۷	۱۲	۱٦	۱۲
۱۱	۸	۳۷	٥٢	٤١
۱۲	۸	۳۷	٥١	٤٣
۱۳	۹	۱۲	۱٦	۱۲



شکل ۱- تاثیر دما (°C ۶۲ -۱۲) و pH (۷-۹) بر فعالیت آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده درون لیپوزوم (A) و آنزیم آزاد (B) توسط روش سطح پاسخ

معادله میکائیلس- منتن که برای تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم فلیورزیم استفاده شد یک رابطه هذلولی را بین سرعت واکنش آنزیمی و غلظت‌های مختلف سوبسترا، در هر دو فرم آنزیم (آزاد و پوشش‌دار شده) نشان داد (شکل۲). ثابت میکائیلیس توسط ارزیابی نتایج مطابق با معادله لاینویور-برگ محاسبه شد. هر دو منحنی لاینویور- برگ در مورد آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم با ضریب همبستگی بالاتر از ۰/۹۹۶، رابطه‌ای خطی را نشان می‌دهد. K_m و V_{max} مربوط به هر دو فرم آنزیم در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که نتایج حاصل از این آزمون نشان می‌دهد پوشش‌دار کردن سبب افزایش ماکزیمم سرعت واکنش (V_{max}) و ثابت میکائیلس- منتن (K_m) شده است. به جهت مقایسه دقیق‌تر ماکزیمم سرعت واکنش در آنزیم آزاد وپوشش‌دار شده به عنوان یک پارامتر مستقل از غلظت آنزیم قدرت کاتالیزوری از (K_{cat}) که حاصل از تقسیم V_{max} به میکرومول غلظت آنزیم در حجم مخلوط واکنش[1] است استفاده می‌شود. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است مقایسه قدرت کاتالیزوری در دو فرم آنزیم نشان دهنده افزایش K_{cat} آنزیم در اثر فرایند پوشش‌دار کردن است.



شکل ۲- نمودار غلظت ماده اولیه در مقابل سرعت واکنش برای آنزیم فلیورزیم آزاد (♦) و پوشش دار شده

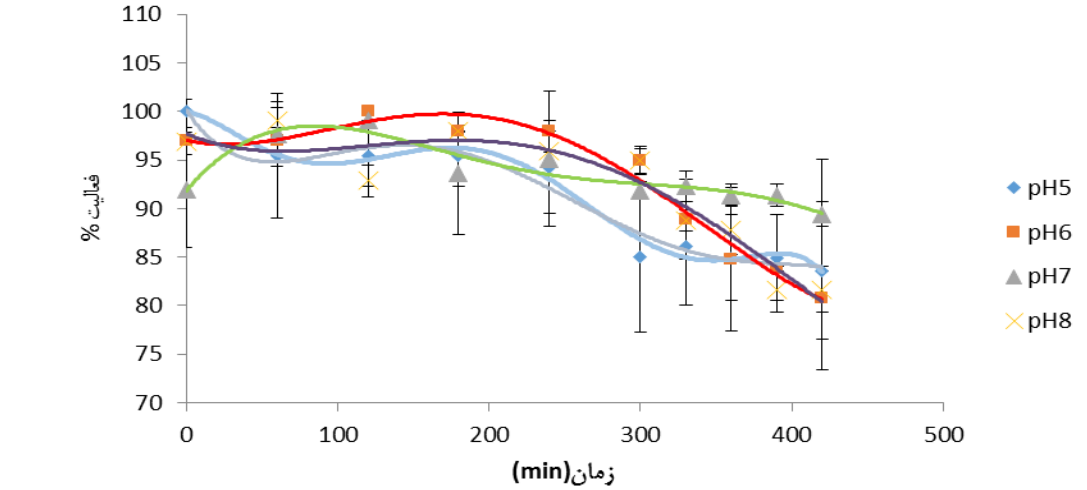
افزایش K_m آنزیم در اثر فرایند پوشش‌دار کردن نشان‌دهنده اطلاعاتی درمورد واکنش آنزیم با پوشش یعنی لیپوزوم و کاهش تمایل به سوبسترا می‌باشد (هیتمن و همکاران ۱۹۹۷). لازم به ذکر است که همواره ملاک انتخاب یک آنزیم در صنعت K_m پایین‌تر (تمایل بیشتر به سوبسترا) و در نتیجه شتاب بیشتر آنزیم در حضور سوبسترای کمتر می‌باشد، اما در ریزپوشانی آنزیم‌های تسریع‌کننده رسیدگی پنیر با توجه به اینکه یکی از اهداف کنترل سرعت واکنش آنزیم با سوبسترا و در نتیجه جلوگیری از تولید پپتیدهای تلخ‌مزه است (به عبارتی کاهش شتاب آنزیم) لذا افزایش K_m در اثر ریزپوشانی مطلوب به نظر می‌رسد (آنجانی و همکاران ۲۰۰۷).

[1] Interaction

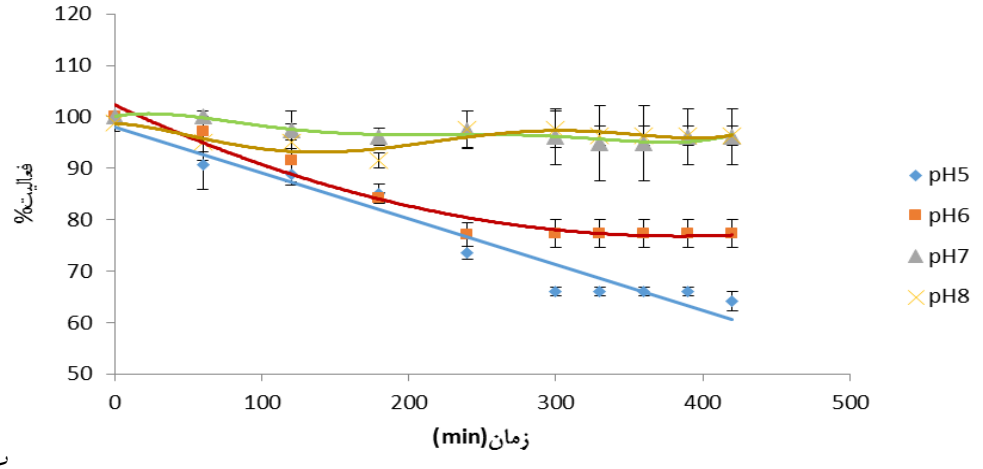
نوگالس و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که پوشش بتاگالاکتوزیداز در لیپوزوم (به روش آبدهی آبگیری) سبب افزایش ثابت میکائیلس- منتن و کاهش ماکزیمم سرعت واکنش شد. نتایج مشابهی نیز از آنزیم گلوکزاکسیداز لیپوزومی (به روش آبدهی آبگیری) گزارش شد (رودریگز و همکاران ۲۰۰۵ و رودریگز ۲۰۰۴). با توجه به عدم استفاده از حلال در روش حرارتی می‌توان عدم بروز کاهش در فعالیت آنزیم را به آن نسبت داد (مظفری ۲۰۰۵).

جدول ۲-میزان K_m، V_{max} و Kcat برای فلیورزیم آزاد و پوشش‌دار شده

	K_m (mM)	V_{max}(µmol/min)	K_{cat} (min^{-1})
آنزیم آزاد	۰/۰±٤٤/۰۳	٤/۰۲×۰±$^{۳-}$۱۰/۰۰۰۳	٦٦±۸٤۷
آنزیم پوشش‌دار شده	۰/۰±۰٦/۰٤	٦/۰۹×۰,۰۰٤±$^{۳-}$۱۰	٥٥٦±۷۰٤۱



الف



ب

شکل ۳- پایداری pH آنزیم فلیورزیم آزاد (الف) و پوشش‌دار شده لیپوزومی (ب) در بافر مخلوط در pH های مختلف

بررسی پایداری آنزیم آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم تحت تاثیر pHهای مختلف

بررسی پایداری آنزیم فلیورزیم قبل و بعد از پوشش در لیپوزوم، در دمای ۳۵°C به مدت ۷ ساعت در چهار pH ۸ تا ۵ در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که شکل نشان می‌دهد در pH ۷ و ۸، آنزیم پوشش‌دار شده در مقایسه با آنزیم آزاد در طول ۷ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵°C، پایداری بیشتری را دارد. به‌طور دقیق‌تر در pH ۷، فعالیت آنزیم پوشش‌دار شده در پایان ساعت هفتم به ۹۶٪، در حالیکه فعالیت آنزیم آزاد به ۸۹٪ می‌رسد. از طرفی در pH ۸ فعالیت آنزیم آزاد تا ۳ ساعت اول ثابت است و پس از آن تا ۸۱/۶٪ کاهش پیدا می‌کند. این درحالی است که فعالیت آنزیم پوشش‌دار شده در ساعت اول، تا ۹۶٪ کاهش پیدا می‌کند. پس از آن تا انتهای آزمون ثابت باقی می‌ماند.

همچنین نتایج مربوط به بررسی پایداری آنزیم در pH ۵ و۶ نشان می‌دهد که آنزیم پوشش‌دار شده در لیپوزوم در مقایسه با آنزیم آزاد پایداری کمتری را در این دو pH نشان می‌دهد. الخلف و همکاران در سال ۱۹۸۹، گزارش کردند که لیپوزوم‌ها حاوی آنزیم در شیر با pH اسیدی پایداری کمتری را از خود نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد شرایط pH اسیدی و پیش تیمار حرارتی که انزیم در حین تولید لیپوزوم به روش حرارتی متحمل شده است موجب کاهش پایداری ساختاری آنزیم در قیاس با آنزیم های بدون پوشش شده است. بنابراین آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده به روش حرارتی، در pH قلیایی در مقایسه با pH اسیدی دارای پایداری مناسب‌تری می‌باشد.

پایداری حرارتی فلیورزیم در حالت آزاد و پوشش‌دار شده در لیپوزوم

پایداری حرارتی آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده درلیپوزوم تولیدی به روش حرارتی، در دماهای ۳۵°C، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ به مدت ۱ ساعت بررسی و درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم اندازه‌گیری شد. شکل ٤ پایداری حرارتی هر دو شکل آنزیم را در شش دمای مورد نظر نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ٤ نشان داده شده است هر دو شکل آنزیم (پوشش دار شده و آزاد) دردمای ۸۵ °C کاملا غیر فعال می‌گردد. پایداری حرارتی آنزیم پوشش‌دار شده در مدت ۱ ساعت در دو دمای ٦٥°C و ۷۵ کمتر از آنزیم آزاد می‌باشد. به‌طوریکه آنزیم پوشش‌دارشده در دمای ۷۵°C، ۲۰٪از فعالیت آن باقی می‌ماند اما پس از ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ٦٥°C فعالیت آن تا ٤٨٪ کاهش پیدا می‌کند.آنزیم پوشش‌دار شده در دمای°C ۳۵، ٤٥ و ٥٥ به مدت یک ساعت پایدار است. دینگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند که بیش از ۵۰٪ فروس گلیسنات پوشش‌دار شده در نانولیپوزوم‌های تولید شده به روش تبخیر فاز معکوس (REV)، که در آب ۱۰۰°C نگهداری شده‌اند در عرض ۲۰ دقیقه به محیط خارج از کپسول رهایش می‌شوند. آزادسازی مواد هسته‌ایی[1]در نانولیپوزوم‌ها به فضای خارج از کپسول به خواص نفوذپذیری و تراوایی غشاء مربوط می‌شود. لذا دینگ و همکاران حرکت سریع‌تر مولکول‌های فروس گلیسنات را که ناشی از دمای زیاد محیط است، علت اصلی نشت آن‌ها به خارج از کپسول قلمداد کردند (دینگ و همکاران ۲۰۱۱). گزارشی مشابه در این خصوص توسط الخالف و همکاران در سال ۱۹۸۹، مربوط به آزادسازی سریع‌تر آنزیم نوترآز[2] پوشش‌دار شده در لیپوزوم‌های تولید شده به روش تبخیر فاز معکوس، در دمای زیاد ارائه شده است، بطوریکه او بیان کرد که رهایش این آنزیم در ٤٠°C، دو و نیم برابر بیش‌تر از ۲۰°C می‌باشد (الخلف و همکاران ۱۹۸۹).

مقایسه روند پروتئولیز به وسیله آنزیم فلیورزیم آزاد و پوشش‌دار شده در شیر

پروتئولیز مهمترین واکنش بیوشیمیایی در طی رسیدگی پنیر است (سوسا و همکاران ۲۰۰۱ و سودا ۱۹۹۳). گزارشات زیادی مبنی بر تسریع رسیدگی پنیر به وسیله اضافه کردن آنزیم‌های ریزپوشانی شده و به این ترتیب جلوگیری از محدودیت‌های مربوط به اضافه کردن

[1] Core material
[2] Neutrase

آنزیم‌های آزاد وجود دارد. دو شاخص پروتئولیز، ازت محلول در pH برابر ٤/٦ WSN/TN و ازت محلول در تری کلرواسید استیک TCA-SN/TN به‌طور معمول در طی رسیدگی پنیر اندازه‌گیری می‌شوند (آذرنیا و همکاران ۲۰۱۱).

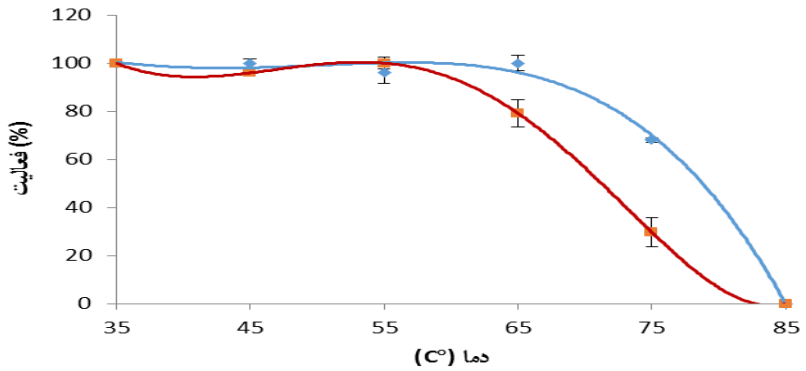
این دو پارامتر در سه نمونه شیر بازسازی شده (حاوی ۲۰٪ ماده خشک و ۰/۹٪ چربی) پاستوریزه، محتوی ۰/۰۳٪ آنزیم فلیورزیم آزاد، پوشش‌دار شده در لیپوزوم و بدون آنزیم (نمونه کنترل) در طی ٤ زمان (۰، ۱ و ٤ ساعت) گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C اندازه‌گیری شد. شکل ٦ نتایج مربوط به اختلاف درصد ازت محلول در تری کلرواستیک اسید (TCA- SN) و ازت محلول در آب (WSN) به ازت کل (TN) را در هر لحظه (۱ و ٤ ساعت از زمان گرمخانه‌گذاری) نسبت به زمان صفر، در سه نمونه شیر مورد بررسی نشان می‌دهد.

همانطور که در شکل ٥ نشان داده شده است اندیس های پروتئولیز در نمونه های شیر بازسازی شده در زمان ۱ و ٤ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری روندی فزاینده را به همراه داشته است. کلیه نمونه‌های شیر حاوی آنزیم فلیورزیم، چه در حالت آزاد و چه پوشش‌دار شده در لیپوزوم دارای سرعت پروتئولیز بالاتری در طول ٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C، در مقایسه با نمونه‌های کنترل هستند. شاخص‌های پروتئولیز در نمونه‌های حاوی آنزیم آزاد پس از ٤ ساعت نگهداری به شدت بیش‌تر از سایر نمونه‌ها می‌باشد ($P<0/05$). نتایج مشابه‌ایی در این‌باره توسط خیدر و همکاران در سال ۲۰۰۲ به‌دست آمد او گزارش کرد که سرعت پروتئولیز درطول دوره رسیدگی نمونه‌های پنیر حاوی آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده در لیپوزوم بالاتر از نمونه‌های کنترل بدون آنزیم است (خیدر و همکاران ۲۰۰۳).

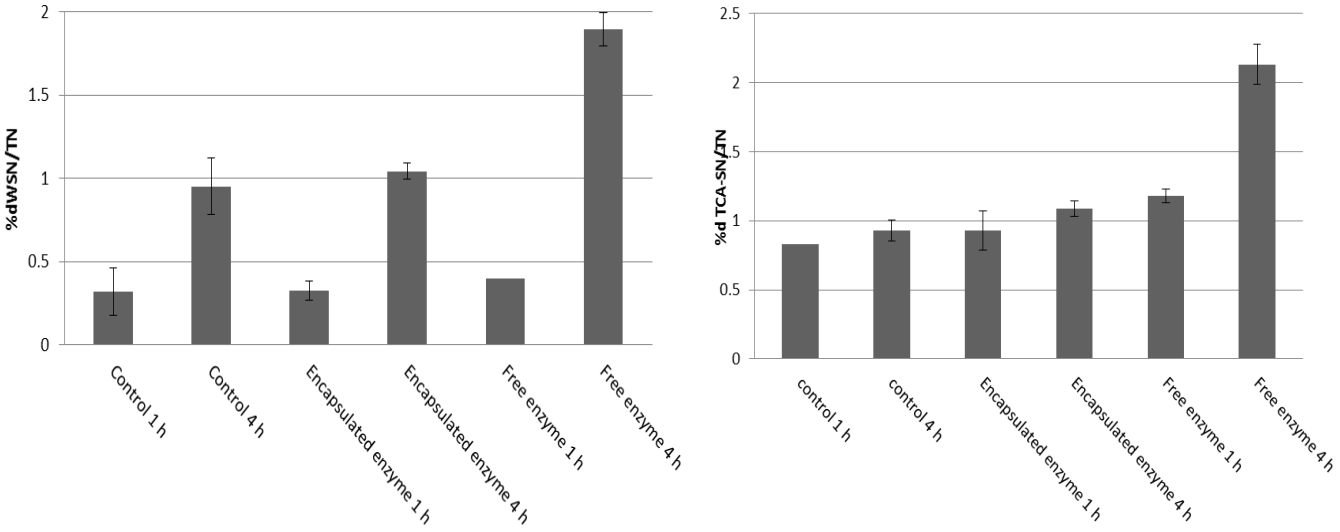
روند پروتئولیز تدریجی در نمونه‌های حاوی آنزیم پوشش‌دار در مقایسه با آنزیم آزاد مشاهده شد.لالوی و همکاران نیز (۱۹۹۸) پروتئولیز پنیر نمونه‌های حاوی آنزیم‌های لیپوزومی را ۳۰٪ کمتر از نمونه‌های حاوی آنزیم آزاد گزارش کردند.

این مشاهده به اثر مهاری لیپوزوم در نشت آنزیم و تماس مستقیم آن با سوبسترا (کازئین) مربوط می‌شود.

بنابراین با توجه به روند پروتئولیز تدریجی آنزیم‌های پوشش‌دار شده، به نظر می‌رسد استفاده از آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده در لیپوزوم‌های تولید شده به روش حرارتی می‌تواند مشکلات مربوط به استفاده از آنزیم‌های آزاد را در تسریع رسیدگی پنیر مرتفع کند.



شکل ۴- پایداری حرارتی آنزیم فلیورزیم آزاد (♦) و پوشش‌دار شده لیپوزومی (■) در دمای ۳۵°C، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ به مدت ۱ ساعت



شکل۵- مقایسه تغییرات dTCA- SN/TN و dWSN/TN در سه نمونه شیر حاوی آنزیم آزاد، پوشش‌دار شده در لیپوزوم و کنترل (بدون تلقیح آنزیم) در زمان‌های ۱ و ۴ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C نسبت به زمان صفر

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد و بخشی از طرح مصوب انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور است. نویسندگان به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر خود را از انستیتو ابراز می‌نمایند.

از شرکت محترم Novozyme جهت اهدای آنزیم فلیورزیم سپاسگزاری می‌شود.

نتیجه گیری کلی

روش حرارتی به عنوان یک روش جدید، ایمن و قابل استفاده در مقیاس بالا می‌تواند جهت پوشش‌دار کردن آنزیم فلیورزیم با راندمان پوشش‌دار کردن (EE%) ۲۱٪/۹ استفاده شود. پارامترهای سینتیکی آنزیم فلیورزیم قبل و بعد از فرایند ریزپوشانی تعیین و مقایسه شد. ثابت میکائیلس- منتن و سرعت ماکزیمم در آنزیم پوشش‌دار شده در لیپوزوم بالاتر از آنزیم آزاد گزارش شد. همچنین آنزیم پوشش‌دار شده پایداری خوبی را در دمای ۳۵°C (برای ٦ ساعت) و دماهای ٤٥°C و ٥٥°C (برای ۳ ساعت) نشان داد. آنزیم پوشش‌دار شده از پایداری بهتری در pH قلیایی ۷ و۸ (در طی ۷ ساعت دوره آزمون) در مقایسه با pH اسیدی برخوردار بود. همچنین در شیر حاوی آنزیم فلیورزیم پوشش‌دار شده در لیپوزوم یک روند پروتئولیز تدریجی در مقایسه با آنزیم آزاد مشاهده شد. لذا به نظر می‌رسد که استفاده از آنزیم‌های فلیورزیم پوشش‌دار شده در لیپوزوم‌های تولید شده به روش حرارتی می‌توانند مشکلات مربوط به پروتئولیز شدید آنزیم‌های آزاد را برطرف کنند.

منابع مورد استفاده

محمدی م، جهادی م، احسانی م ر، خسروی دارانی ک، ۱۳۹۱، کاربرد نانوحاملهای لیپوزومی حاوی آنزیم در تولید و رسیدن پنیر، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۷، ٤. ۳٤-۲۵.

Alkhalaf W, El Soda M, Gripon JC and Vassal L, 1989. Acceleration of cheese ripening with liposomes entrapped proteinase: influence of liposomes net charge. Journal of Dairy Science 72: 2233–2238.

Anjani K, Kailasapathy K and Phillips M, 2007. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. International Dairy Journal 17: 79–86.

AOAC, Official Methods of Analysis, Vol. 2, 15th ed., Association of official analytical chemists, AOAC No. 920.123, 998.05, Arlington, 1990.

Azarnia S, Lee B, St-Gelais D, Kilcawley K and Noroozi E, 2011. Effect of free and encapsulated recombinant aminopeptidase on proteolytic indices and sensory characteristics of Cheddar cheese. LWT: Food Science and Technology 44: 570–575.

Boyaci IH, 2005. A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal 25: 55–62.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.

Chang MY and Juang RS, 2007. Use of chitosan–clay composite as immobilization sup-port for improved activity and stability of [β]-glucosidase. Biochemical Engineering Journal 35: 93–98.

Colas JC, Shi W, Rao VSNM, Omri A, Mozafari MR and Singh H, 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. Micron 38: 841–847.

Ding B, Zhang X, Hayat K, Xia S, Jia C, Xie M and Liu C, 2011. Preparation, characterization and the stability of ferrous glycinate nanoliposomes. Journal of Food Engineering 102: 202–208.

Heitmann T, Wenzig E and Mersmann A. 1997. Characterization of three different potato starches and kinetics of their enzymatic hydrolysis by an [alpha]-amylase. Enzyme and Microbial Technology 20(4): 259-267.

Jahadi M, Khosravi-Darani K, Ehsani MR, Mozafari MR, Saboury AA and Puorhossein P, 2015. The encapsulation of flavourzyme in nanoliposome by heating method. Journal of Food Science and technology 52(4): 2063-2072.

Kailasapathy K and Lam SH, 2005. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. International Dairy Journal 15: 929–939.

Keller BC, 2001. Liposomes in nutrition. Trends Food Science and Technology 12: 25–31.

Kheadr EE, Vuillemard JC and El-Deeb SA, 2000. Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. International Journal of Food Science and Technology 35: 483–495.

Kheadr EE, Vuillemard JC and El-Deeb SA, 2003. Impact of liposome encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. Food Research International 36: 241–252.

Kheadr EE, Vuillemard JC and El-Deeb SA, 2002. Acceleration of Cheddar cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases. Journal of Food Science 67: 485–492.

Khosravi-Darani K and Zoghi A, 2008. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: experimental design for citric acid production. Bioresource Technology 99: 6986–6993.

Kim HHY and Baianu IC, 1991. Novel liposome microencapsulation techniques for food applications. Trends Food Science and Technology 2: 55–61.

Korhonen H and Pihlanto A, 2006. Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal 16: 945–960.

Laloy E, Vuillemard JC, Dufour P and Simard R, 1998. Release of enzymes from liposomes during cheese ripening. Journal of Control Release 54: 213–222.

Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty A and Yurdugul S, 2008. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. International Journal of Food Properties 11: 833–844.

Mozafari MR. 2005. Liposomes: An overview of manufacturing techniques. Cellular and Molecular Biology Letters 10: 711- 719.

Mortazavi SA, Mohammadabadi MR, Khosravi-Darani K and Mozafari MR, 2007. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. Journal of Biotechnology 129: 604–613.

Picon A, Gaya P, Medina M and Nu˜nez M, 1995. The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. Journal of Dairy Science 78 1238–1247.

Rodriguez-Nogales MJ. 2004. Kinetic behaviour and stability of glucose oxidase entrapped in liposomes. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 79(1): 72-78.

Rodriguez-Nogales MJ and Delgadillo A. 2005. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated [beta]-galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 33(1-2): 15-21.

Skeie S, Aamodt S and Abrahamsen RK, 1993. Liposome-encapsulated neutrase, function in cheese milk. International Dairy Journal 3: 572–573.

Sousa MJ, Ardö Y and McSweeney PLH. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal 11(4-7): 327-345.

Soda M El, 1993. Accelerated maturation of cheese. International Dairy Journal 3: 531–544.

Whitaker J. 2002. Protein structure and kinetics of enzyme reactions, Handbook of food enzymology. E-publishing Inc. New York.

Liposomal encapsulation of flavourzyme and its impact on kinetic properties

Z Vafabakhsh[1], K Khosravi-Darani[2*], SA Mortazavi[3], K Khajeh[4], M Jahadi[5], M Mohammadi[6], Gh Bahramian[7] And R Komeili-Fonood[6]

Received: May 19, 2014 Accepted: August 12, 2015

[1]MSc Graduated Student, Department of Food Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Associate Professor, Research Department of Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Food Scince and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[4] Professor, Department of Biology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[5]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[6]Expert, Department of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[7]MSc Student, Food Sciences and Technologies- Food Processing, Faculty of Food Technology, Azad Islamic University, Ayatollah Amoli Branch,Amol, Iran
[*]Corresponding author: Email: k.khosravi@sbmu.ac.ir

Abstract
Acceleration of cheese ripening is interesting for researchers in the field of food technology. The purpose of this study was encapsulation of Flavourzyme in liposome by heating method and evaluation of its kinetic properties before and after encapsulation. The impact of temperature (12-62°C) and pH (7-9) was investigated on enzyme activity by central composite with 13 treatments. Liposome was prepared by modification of heating method and by phosphatidil choline, Flavourzyme and cholestrol in the amount of 4.500, 0.675 and 0.225 (%w/w), respectively. Enzyme activity was measured base on enzyme reaction with initial material of L-Leucin P nitroanilid. Kinetic studies indicated an increase in both Michaelis–Menten constant and maximum velocity in encapsulated Flavourzyme (P<0.05). Optimum incubation temperature and pH of encapsulated enzyme did not show any significant difference in compare to free enzyme. Evaluation of the thermal stability (at 35, 45 and 55°C) showed that encapsulated enzyme was stable at 35°C during 6 h. Also a decrease of stability of encapsulated enzyme has been observed at 65 and 75°C in 1 h. The results showed increased stability of encapsulated enzymes in pH 7 and 8 (7 h), while it was decreased in acidic condition. The results showed that liposomal encapsulation by heating method did not cause any significant difference on kinetic characteristics of enzyme Flavourzyme but comparison of proteolysis in sample and control indicated gradually proteolysis of casein in the case of liposomal enzyme application. So, it can be concluded that preparation of liposome by heating method is a suitable approach for encapsulation of protease for acceleration of cheese ripening.

Keywords: Flavourzyme, Encapsulation, Liposome, Kinetic parameters